

欧亚旋覆花总黄酮对糖基化终末产物诱导 L929 细胞衰老及 RAGE 表达的影响

刘 露¹, 龙媛媛¹, 郭宗雨¹, 唐 维², 果 磊^{1*}

1. 重庆医科大学附属第一医院 烧伤整形美容外科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院 神经外科, 重庆 400016

摘要: 目的 探讨欧亚旋覆花总黄酮 (IBFTF) 对糖基化终末产物 (AGEs) 诱导小鼠皮肤成纤维细胞株 L929 衰老的保护作用, 和 AGEs 特异性受体 (RAGE) 的表达机制。方法 采用 0.100 g/L AGEs 培养液刺激离体培养的 L929 细胞 48 h 制备衰老模型, 药物组分别给予不同质量浓度 IBFTF (0.1、0.2、0.4 g/L) 继续作用 6 h, 阳性对照组给予 0.1 g/L 氨基胍半硫酸盐 (AG) 继续作用 6 h, 对照组给予完全培养液。检测胞内 β -半乳糖苷酶阳性染色细胞数量和细胞周期比例等衰老指标; 检测胞内活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 水平等氧化应激指标。采用细胞免疫荧光检测 RAGE 荧光强度, Western blotting 和 qRT-PCR 分别检测 RAGE 蛋白和 mRNA 表达情况。结果 IBFTF 可显著抑制 AGEs 诱导的 L929 细胞衰老并降低 RAGE 的蛋白和 mRNA 表达水平; 不同质量浓度 IBFTF 作用于衰老的 L929 细胞后, 可显著提高胞内 SOD 活性, 显著降低 MDA 和 ROS 水平, 具有浓度依赖性。结论 IBFTF 对 AGEs 诱导衰老的 L929 细胞有保护作用, 其机制可能是通过抑制 RAGE 表达来实现的。

关键词: 欧亚旋覆花总黄酮; 糖基化终末产物; 糖基化终末产物特异性受体; 衰老; 皮肤成纤维细胞; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 活性氧

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0626-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.018

Inula britannica flower total flavonoids inhibiting expression of RAGE in aging L929 cells induced by advanced glycation end products

LIU Lu¹, LONG Yuan-yuan¹, GUO Zong-yu¹, TANG Wei², GUO Lei¹

1. Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of *Inula britannica* flower total flavonoids (IBFTF) on aging L929 cells induced by advanced glycation end products (AGEs), and to explore the mechanism of the expression of receptor advanced glycation end products (RAGE). **Methods** The senescence L929 cells model was established by using 0.100 g/L AGEs for 48 h culture *in vitro*, and then different concentration of IBFTF (0.1, 0.2, and 0.4 g/L) was given to the treatment group for 6 h culture, and 0.1 g/L aminoguanidine hemisulphate (AG) was given to the positive group for another 6 h culture, and while blank group was cultured with common culture medium. Senescence aging index of β -galactosidase staining cell numbers and cell cycle analysis in L929 cells were measured. The levels of reactive oxygen species associated with oxidative stress in the cells, and aging indicators such as superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) were also examined. The fluorescent intensity of RAGE was detected by immunofluorescence. The expression of RAGE protein and mRNA was detected by Western blotting and qPCR, respectively. **Results** IBFTF significantly inhibited AGEs-induced L929 cells senescence and decreased RAGE protein and mRNA expression. Different concentrations of IBFTF could significantly increase the SOD activity and reduce the MDA content and eliminate the reactive oxygen species in aging L929 cells in a dose-dependent manner. **Conclusion** Protective effect of IBFTF on aging L929 cells induced by AGEs may be related to its effect on the suppressing the expression of RAGE.

Key words: *Inula britannica* flower total flavonoids; advanced glycation end products; receptor advanced glycation end products; aging; L929; SOD; MDA; oxygen species

收稿日期: 2017-06-18

基金项目: 重庆市卫生局中医药科技资助项目 (ZY20132123)

作者简介: 刘 露 (1991—), 女, 在读研究生, 研究方向为中医药延缓皮肤衰老。Tel: 13678467841 E-mail: 395019936@qq.com

*通信作者 果 磊 (1968—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中医药延缓皮肤衰老。Tel: (023)89012705 E-mail: 841602937@qq.com

真皮成纤维细胞是皮肤组织的重要结构功能细胞,皮肤的衰老首先表现为皮肤成纤维细胞的衰老。导致衰老的原因错综复杂,主要为端粒缩短、癌基因激活及活性氧自由基引起的DNA损伤等,而至关重要的原因为活性氧(ROS)自由基平衡紊乱^[1]。目前已有研究发现糖基化终末产物(AGEs)可通过诱导细胞凋亡、氧化应激或细胞毒性等作用来影响皮肤成纤维细胞的活力和状态,从而改变皮肤的状态^[2-4]。还可与蛋白的游离氨基交联而改变蛋白质结构,引起蛋白质硬化和功能酶损伤,破坏正常的皮肤成纤维细胞结构,扰乱细胞/组织的正常生理功能,导致细胞衰老甚至死亡^[5]。这些生物反应均可由AGEs特异性受体(RAGE)介导改变^[6]。AGEs与RAGE相互作用改变细胞信号传导,增强促炎细胞因子的释放,并通过降低氧化酶活性增加细胞内ROS水平^[7]。如果生物学特征被改变,其正常物理性质也会被破坏,这样就能解释随年龄增长所致的皮肤弹性损失。因此延缓皮肤成纤维细胞的衰老是目前药学等学科的研究热点。

国内外众多学者旨在从天然植物中提取出安全性高且具有显著抗炎、抗氧化、抗衰老效果的成分。欧亚旋覆花序煎汁具有抗菌、解表祛痰等多种疗效^[8],是传统中药学中的重要植物。欧亚旋覆花为菊科木香属植物 *Inula britannica* L., 广泛分布在亚洲、欧洲和非洲,其提取物具有多种生物活性,如抗肿瘤、抗菌、保肝、抗炎、抗氧化活性,其抗氧化活性与黄酮类成分密切相关^[9]。目前尚未有相关研究证实欧亚旋覆花总黄酮(*Inula britannica* flower total flavonoids, IBFTF)能通过抑制RAGE受体表达来阻断AGEs对皮肤成纤维细胞氧化应激,起到保护细胞/组织,延缓衰老的作用。本实验以AGEs诱导小鼠皮肤成纤维细胞株L929衰老为实验模型,观察其生物学变化,并探讨IBFTF延缓皮肤衰老的可能机制,为临床上延缓衰老的研究提供实验基础。

1 材料

1.1 药材

欧亚旋覆花购自重庆中药材市场,由重庆医科大学中医研究所曹伟国教授鉴定为菊科木香属植物欧亚旋覆花 *Inula britannica* L. 的花序。

1.2 细胞、试剂和抗体

小鼠皮肤成纤维细胞株(NCTC clone 929, L929)购自上海江林生物科技有限公司(货号JL10293,

由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心引进);D-甘油醛、苯甲磺酰氟和氨基胍半硫酸盐(AG)均购自Sigma公司;PD-G25色谱透析柱购自GE Healthcare Life Sciences公司;胎牛血清购自Gemini公司;MEM培养基购自Gibco公司;CKK-8试剂盒购自日本株式会社同仁化学研究所;超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)商业试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; β -半乳糖苷酶细胞化学染色试剂盒和DCFH-DA活性氧检测试剂盒均购自碧云天生物科技有限公司技术研究所;RAGE和GAPDH一抗、鼠和兔二抗购自博奥森生物有限公司;Alexa Flour[®]594标记山羊抗兔(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验仪器

超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);LC-15型液相色谱仪(日本岛津公司);CFX-96 real time系统(美国Bio-Rad公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);全波长酶标仪(瑞士TECAN公司);荧光显微镜(日本Nikon公司);低温离心机(美国Sigma公司);电子秤(上海民桥精密科学仪器有限公司);电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 IBFTF的制备^[9]

将欧亚旋覆花在双蒸水中煮沸1 h,纱布滤过留滤液,弃药渣。AB-8树脂柱富集,调整上样量为20 mg/mL,体积流量2 mL/min,70%乙醇洗脱得到提取液。将1 mL提取液与1 mL 5% NaNO₂混匀,静置6 min,加入1 mL 10% Al(NO₃)₃和10 mL 4% NaOH混匀,静置6 min,再加入50%乙醇定容至25 mL,混匀后静置15 min。芦丁作为参考标准,510 nm处测吸光度。测得IBFTF中总黄酮质量分数82.6%, -20℃避光保存。

2.2 AGEs的制备^[10-11]

参照文献方法^[10],50 mg/mL胎牛血清、100 mmol/L D-甘油醛、1 mmol/L苯甲磺酰氟在37℃下PBS(pH 7.4)中超声促溶混匀,0.22 μ m滤膜滤过,于无菌条件下放置在37℃恒温孵育箱中避光反应7 d。以PD-G25脱盐柱去除色谱,条件如下:缓慢上样,保持上样体积流量为0.5 mL/min,上样范围为0.1~0.5 mL/次,使用PBS(pH 7.4, 0.02 mol/L)洗脱,收集上清液。各样品重复透析2次,确保充分去除未结合的物质和多余水分。

参照文献方法^[11]鉴定 AGEs: 以胎牛血清作为对照, PBS 调零, 于激发波长 360 nm, 发射波长 430 nm, 测定荧光值并荧光光谱扫描, 计算底物中 AGEs 的量为 89.01 U/mg, -20 °C 保存备用。根据国际酶活性单位换算 (1 U=0.5 ng), 计算得到底物质量分数为 4.45%, 使用完全培养基稀释为本实验所用质量浓度 0.025、0.050、0.100 g/L。

2.3 AGEs 诱导 L929 衰老的最适质量浓度筛选

L929 细胞使用含有 10% 胎牛血清、1% 抗生素的 MEM 培养液, 置于含 5% CO₂ 生化孵育箱中 37 °C 培养, 以 5×10³/孔接种于 96 孔板, 每组设 5 个平行组。无血清培养液同步 24 h 后, 随机分为 4 组: 对照组仅加入完全培养基, 其余 3 组加入等体积不同质量浓度的 AGEs (0.025、0.050、0.100 g/L) 培养基进行细胞培养, 连续培养 48 h。

2.3.1 CCK-8 法测细胞生长活力 移去各组细胞培养上清液, 加入 100 μL 10% CCK-8 培养液 37 °C 孵育 4 h, 450 nm 处测吸光度 (A) 值, 以药物组与对照组吸光度比值计算各组细胞活力。使用 Graphpad Prism 5 制图。

2.3.2 细胞周期分析 收集各组细胞, PBS (pH 7.4) 重悬细胞至 1×10⁶/mL, 用预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜, 碘化丙啶 37 °C 避光染色, 流式细胞仪检测细胞周期, 多周期软件进行分析。

2.3.3 衰老相关 β-半乳糖苷酶细胞染色 参照 β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书步骤, 普通光学显微镜下呈蓝染即衰老细胞, 随机选取 4 个高倍镜视野计数阳性染色细胞数量。

2.4 IBFTF 对 AGEs 诱导衰老 L929 细胞保护作用

2.4.1 分组及药物处理 选用 L929 细胞, 随机分为 6 组: 对照组 (完全培养基)、模型组 (0.100 g/L AGEs)、IBFTF 低剂量组 (0.100 g/L AGEs+0.1 g/L IBFTF)、IBFTF 中剂量组 (0.100 g/L AGEs+0.2 g/L IBFTF)、IBFTF 高剂量组 (0.100 g/L AGEs+0.4 g/L IBFTF)、阳性对照组 (0.100 g/L AGEs+0.1 g/L AG)。对照组使用完全培养基培养, 其余组用 0.1 g/L AGEs 连续培养 48 h, IBFTF 低、中、高剂量组更换为含 0.1、0.2、0.4 g/L IBFTF 培养基, 阳性对照组更换为含 0.1 g/L AG 培养基继续培养 6 h。

2.4.2 Western blotting 分析细胞膜受体 RAGE 蛋白表达 RIPA 裂解液抽提各组细胞蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 具体步骤参照文献方法^[12], 采用 Image Lab 以目的蛋白/GAPDH 进行半定量分析。

2.4.3 免疫荧光染色 具体步骤参照文献方法^[13], 以 RAGE 一抗 (1:200) 孵育过夜, 羊抗兔 IgG (绿色荧光) 室温避光染色 1 h, DAPI (蓝色荧光) 染核 10 min, 封片后荧光显微镜下采集图片, Ipp 6.0 分析荧光强度。

2.4.4 实时荧光定量 PCR 检测 IBFTF 对 RAGE mRNA 的影响 Trizol 抽提总 RNA, 按照 TakaRa 逆转录说明书合成相应 cDNA 并扩增, RAGE 和 GAPDH 引物序列参考文献方法^[14] (表 1), 反应总体积 15 μL (SYBR Green 3 μL、DEPC 水 10 μL、上下引物各 0.5 μL, cDNA 200 ng/μL 1 μL)。扩增条件均为 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 33 个循环。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of PCR primers

基因	引物序列	引物大小/bp
RAGE	上游: 5'-CACCTTCTCTGTAGCTTCA-3'	480
	下游: 5'-TGCCACAAGATGACCCCAAT-3'	
GAPDH	上游: 5'-GCCAAGTATGATGACATCAA-3'	202
	下游: 5'-CCATATTCATTGTCATACCA-3'	

2.4.5 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平 参照 DCFH-DA 试剂盒说明书, 收集各组细胞, 流式细胞仪检测荧光参数。以测定组/空白组计算各组平均荧光强度相对值, GraphPad Prims 5 制图。

2.4.6 抗氧化酶活性分析 胰酶消化后收集各组细胞, 冰浴下超声破碎为细胞裂解液, 裂解液中的 SOD 和 MDA 测定均参照说明书步骤操作。

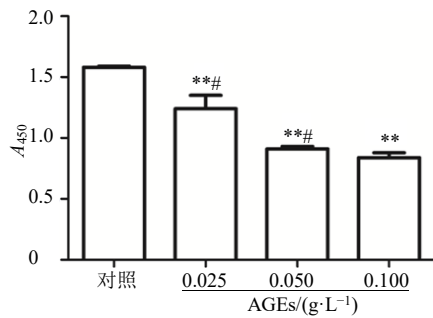
2.5 统计学分析

采用 $\bar{x} \pm s$, 使用软件 SPSS 19.0 处理数据, 多组间处理采用单因素 χ^2 分析, 各组间两两比较采用 LSD 法。

3 结果

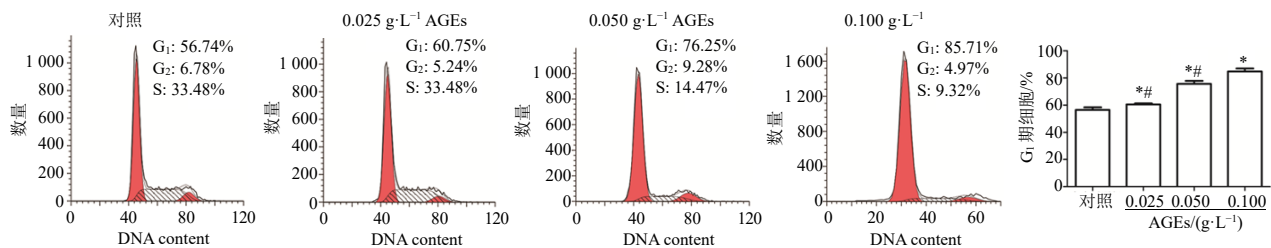
3.1 AGEs 诱导 L929 细胞衰老的最佳质量浓度

3.1.1 不同质量浓度 AGEs 对细胞生长的影响 对照组及 AGEs 各质量浓度组组间比较, 差异显著 ($P < 0.01$), AGEs 各组细胞生长活力明显低于对照组。0.025、0.050 g/L AGEs 组细胞活力明显高于 0.100 g/L AGEs 组 ($P < 0.05$), 结果见图 1。随 AGEs 质量浓度增加, 对细胞活力的抑制作用增强, 说明 AGEs 对 L929 的抑制作用与质量浓度呈正相关, 0.100 g/L AGEs 能显著抑制细胞生长。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 0.100 g·L⁻¹ AGEs 组比较: # $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 0.100 g·L⁻¹ AGEs group

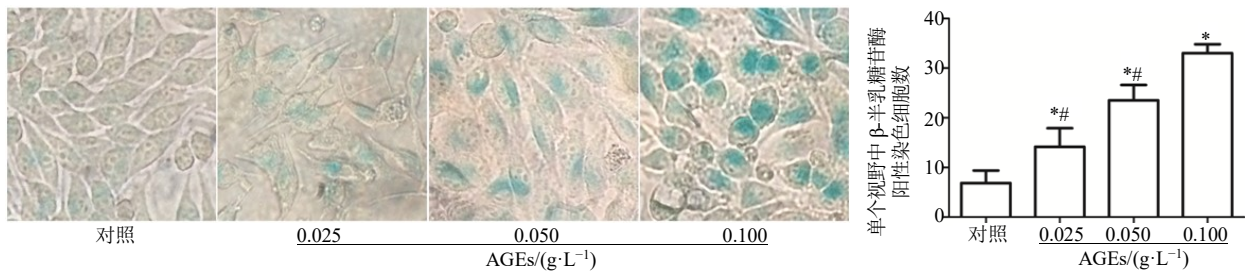
图 1 不同质量浓度 AGEs 对 L929 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Effects of AGEs at various concentrations on cell growth activity of L929 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 0.100 g·L⁻¹ AGEs 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 0.100 g·L⁻¹ AGEs group

图 2 不同质量浓度 AGEs 对 L929 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of AGEs at various concentrations on cell cycle distribution of L929 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 0.100 g·L⁻¹ AGEs 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 0.100 g·L⁻¹ AGEs group

图 3 β-半乳糖苷酶阳性染色细胞定量分析 ($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Quantitative analysis of β-galactosidase staining cells ($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 IBFTF 通过介导 RAGE 受体表达对 AGEs 诱导衰老的 L929 细胞的保护作用

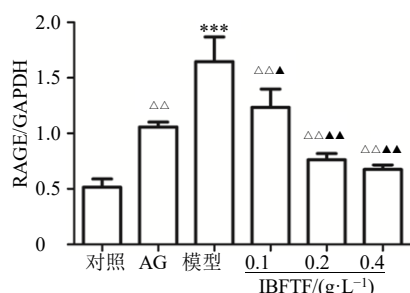
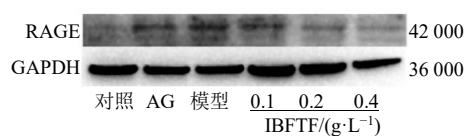
3.2.1 Western blotting 检测 IBFTF 介导细胞中 RAGE 受体表达情况 结果见图 4。模型组 RAGE 相对表达量明显高于对照组 ($P < 0.001$); AG 组与各质量浓度 IBFTF 组 RAGE 相对表达量明显低于模型组 ($P < 0.01$); 与 AG 组相比, IBFTF 低剂量组 RAGE 相对表达量明显增高 ($P < 0.05$), IBFTF

3.1.2 不同质量浓度 AGEs 对细胞周期的影响 流式细胞术进行多周期分析, 结果见图 2, AGEs 各组 G₁ 期细胞数量明显高于对照组 ($P < 0.05$); 0.100 g/L AGEs 组 G₁ 期细胞数量明显高于 0.025、0.050 g/L AGEs 组 ($P < 0.001$)。说明 AGEs 呈质量浓度梯度性将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期, 0.100 g/L AGEs 阻滞效果最显著。

3.1.3 不同质量浓度 AGEs 对细胞中 β-半乳糖苷酶活性的影响 结果见图 3。AGEs 各组阳性染色细胞数明显高于对照组 ($P < 0.05$); 0.100 g/L AGEs 组阳性染色细胞数量明显高于 0.025、0.050 g/L AGEs 组 ($P < 0.01$)。说明 AGEs 诱导 L929 衰老的程度与质量浓度呈正相关, 0.100 g/L AGEs 能显著诱导细胞衰老。

中、高剂量组 RAGE 相对表达量明显降低 ($P < 0.01$)。

3.2.2 免疫荧光验证 IBFTF 对细胞膜受体 RAGE 表达量的影响 免疫荧光观察对 RAGE 表达的影响, 结果见图 5。模型组 RAGE 荧光强度明显高于对照组 ($P < 0.01$); 说明 AGEs 可提高 RAGE 蛋白表达水平, 而 IBFTF 可下调 RAGE 膜受体表达。AG 组与各质量浓度 IBFTF 组 RAGE 荧光强度明显



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$;

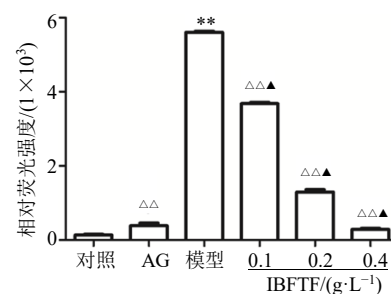
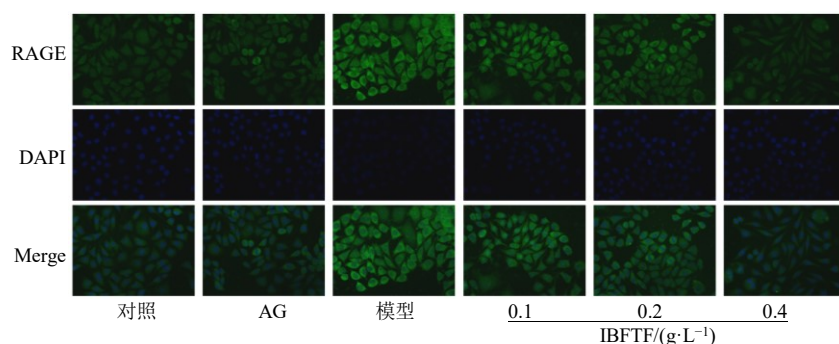
与AG组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs control group; △△ $P < 0.05$ vs model group;

▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs AG group

图4 Western blotting 检测细胞中 RAGE 蛋白表达结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Western blotting results of protein expression of RAGE ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$; 与AG组比较: ▲ $P < 0.05$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.05$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ vs AG group, same as below

图5 IBFTF 对细胞膜受体 RAGE 荧光强度的影响 ($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effects of IBFTF on fluorescent intensity of RAGE in cytomembrane ($\times 400, \bar{x} \pm s, n = 5$)

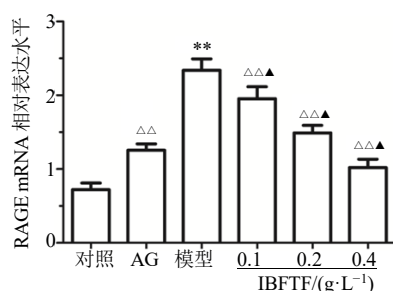


图6 实时定量PCR检测RAGE mRNA相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Real time qPCR analysis of expression of RAGE mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

低于模型组 ($P < 0.01$); IBFTF 低、中剂量组 RAGE 荧光强度高于 AG 组 ($P < 0.05$), 高剂量组 RAGE 荧光强度低于 AG 组 ($P < 0.05$)。

3.2.3 IBFTF 对细胞膜受体 RAGE mRNA 表达的影响 结果见图 6, AGEs 可增强 RAGE mRNA 表达, 而 IBFTF 可下调 RAGE mRNA 水平。与对照组相比, 模型组 RAGE mRNA 显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各质量浓度 IBFTF 组和 AG 组 RAGE mRNA 水平明显降低 ($P < 0.01$)。与 AG 组相比, IBFTF 低、中质量浓度组 RAGE mRNA 水平明显增高 ($P < 0.05$), IBFTF 高质量浓度组 RAGE mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.2.4 ROS 检测结果 模型组 ROS 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$); AG 组与各质量浓度 IBFTF 组 ROS 水平明显低于模型组 ($P < 0.01$); IBFTF 低、中质量浓度组 ROS 水平高于 AG 组 ($P < 0.05$), 高质量浓度组 ROS 水平低于 AG 组 ($P < 0.05$)。提示 IBFTF 呈质量浓度梯度性抑制细胞中过氧化水平 (图 7)。

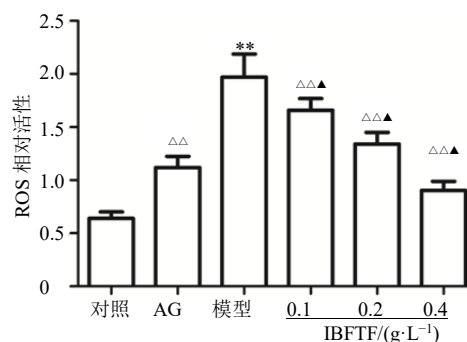


图7 IBFTF 对 ROS 产生的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effects of IBFTF on generation of ROS ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2.5 IBFTF 对 L929 细胞中 SOD 和 MDA 的影响 结果见表 2。AGEs 可抑制 SOD 活性，而 IBFTF 可上调 SOD 活性。模型组 SOD 活性显著低于对照组 ($P<0.01$)；IBFTF 低、中、高剂量组与 AG 组 SOD 活性明显高于模型组 ($P<0.01$)；IBFTF 低、中质量浓度组 SOD 活性明显低于 AG 组 ($P<0.05$)，而 IBFTF 高质量浓度组 SOD 活性明显高于 AG 组 ($P<0.05$)。

AGEs 可提高脂质过氧化水平，而 IBFTF 可抑制 AGEs 的过氧化作用，模型组 MDA 水平显著高于对照组 ($P<0.01$)；IBFTF 低、中、高剂量组与 AG 组 MDA 水平明显低于模型组 ($P<0.01$)；IBFTF 低剂量组 MDA 水平高于 AG 组 ($P<0.05$)，IBFTF 中、高剂量组 MDA 水平低于 AG 组 ($P<0.05$)。

表 2 IBFTF 对 L929 细胞中 SOD 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effects of IBFTF at various concentrations on content of SOD and MDA in cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
对照	—	49.93±2.31	0.64±0.11
AG	0.1	40.05±2.25 ^{△△}	1.84±0.08 ^{**}
模型	—	15.40±2.94 ^{**}	2.51±0.04 ^{**}
IBFTF	0.1	23.52±3.02 ^{△△△}	2.10±0.10 ^{△△△}
	0.2	30.89±3.38 ^{△△△}	1.64±0.10 ^{△△△}
	0.4	44.94±1.67 ^{△△△}	1.16±0.09 ^{△△△}

4 讨论

老化皮肤的成纤维细胞会出现不可逆生长抑制，活力下降，自身修复能力降低等衰老表现。Seoungwoo 等^[15]在研究中发现 AGEs 可诱导皮肤中纤维蛋白-1 的合成降低，从而引起皮肤皱纹加深、加长等衰老表现，证明 AGEs 与皮肤衰老密切相关。由于衰老细胞在 pH 6.0 时 β-半乳糖苷酶活性上升且呈高表达，故可作为细胞衰老的分子生物标记^[16]。本实验以不同质量浓度 AGEs 作用于成纤维细胞 48 h 后，观察了 AGEs 对成纤维细胞生长、细胞周期以及衰老相关 β-半乳糖苷酶的变化，结果显示 AGEs 可提高细胞内衰老相关 β-半乳糖苷酶活性，诱导细胞周期阻滞，更新速度减缓，诱发衰老现象。这在 CCK8 实验中也得以验证，0.100 g/L AGEs 内生物膜上的脂质而生成的产物，可直接反映细胞内过氧化程度^[17]。祖国传统医学认为“诸花皆升，旋覆花独降”，指明欧亚旋覆花具有消痰行水、降气

止呕的作用，且国内外学者 Huang 等^[8]和吴一兵等^[18]经药理学研究分析后得出，欧亚旋覆花主要提取成分有黄酮类、倍半萜类和糖类等多种化合物，具有抗氧化、抗肝炎、抗肿瘤等多种生物活性，其总黄酮成分具有极强抗氧化活性。因此，本实验在 0.100 g/L AGEs 诱导 L929 衰老的情况下，研究 IBFTF 对皮肤成纤维细胞的保护作用。通过蛋白免疫印迹、实时定量 PCR 和免疫荧光检测 RAGE 的表达水平，结果提示，与模型组相比，IBFTF 低、中、高剂量组 RAGE 蛋白和 mRNA 表达水平及 RAGE 荧光强度显著降低，具有剂量依赖性，说明 IBFTF 可以抑制 RAGE 蛋白和 mRNA 的表达，这与 Vetter 等^[7]的研究结果相符。同时，观察到 AGEs 作用于细胞 48 h 后可明显抑制细胞增殖，证明 AGEs 可抑制细胞生长，诱发细胞衰老现象，且呈浓度依赖性。因此确定 0.100 g/L AGEs 可诱导细胞衰老。

Vetter 等^[7]认为 AGEs 诱发衰老的根本原因可能是由于 AGEs 与细胞膜表面 RAGE 结合，并上调 RAGE 的表达，激活 NF-κB 等转录因子和多条应激通路，产生大量 ROS，引发细胞内的氧化应激。细胞抗氧化能力下降，表现为细胞内抗氧化酶活力降低，对 ROS 的清除能力减弱。ROS 引起脂质过氧化作用，并形成脂质过氧化物（如 MDA）以及新的 ROS 自由基等，进一步加重机体氧化应激反应，形成恶性循环，加速衰老进程^[19]。SOD 是机体主要抗氧化酶，其活性水平可反映机体对活性氧的清除能力，间接反映机体衰老程度^[20]，MDA 是 ROS 通过过氧化作用靶向攻击机体细胞内过氧化水平变化情况，结果发现，IBFTF 可以提高 SOD 活性，降低 MDA 和活性氧水平，对 AGEs 诱导 L929 的衰老有保护作用，具有剂量依赖性。可能在于 IBFTF 阻断了 AGEs 与其特异性膜受体 RAGE 的相互结合。

综上，本实验利用体外培养 L929 建立细胞衰老模型，通过 AGEs 诱导细胞衰老状态，并采用细胞增殖率、衰老相关 β-半乳糖苷酶活性检测、流式细胞周期检测、抗氧化酶活性、MDA 及 ROS，免疫蛋白印记，免疫荧光标记和荧光定量检测等多个方法和指标，观察了 IBFTF 对该衰老模型的保护作用。研究过程中发现，0.100 g/L AGEs 可明显诱导细胞衰老，而 IBFTF 对 AGEs 造成的细胞衰老具有明显抑制作用，其机制可能与抑制 RAGE 的表达有关，具有剂量依赖性，提示其可能具有延缓衰老的良好药效。这为寻求安全性高且天然的植物提取成

分来延缓皮肤衰老的实验研究提供了可靠的研究基础。

参考文献

- [1] Yin D, Chen K. The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions [J]. *Exper Gerontol*, 2005, 40(6): 455-465.
- [2] Alikhani Z, Alikhani M, Boyd C M, *et al.* Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12087-12095.
- [3] Alikhani M, Maclellan C M, Raptis M, *et al.* Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor [J]. *Amer J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(2): C850.
- [4] Ravelojaona V, Robert A M, Robert L. Expression of senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2009, 48(2): 151.
- [5] 陈睿, 雷燕. 非酶糖基化与血管老化的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(2): 190-195.
- [6] Barlovic D P, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm K A. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes [J]. *Clin Sci*, 2011, 121(2): 43-55.
- [7] Vetter S W. Glycated serum albumin and AGE receptors [J]. *Adv Clin Chem*, 2015, 72: 205-275.
- [8] Huang J, Cheng Z H, Xie H H, *et al.* Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities [J]. *Molecules*, 2010, 15(3): 1562-1577.
- [9] 陈慧, 龙媛媛, 果磊. 欧亚旋覆花总黄酮对 D-半乳糖衰老模型的小鼠的抗衰老作用 [J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(10): 1010-1015.
- [10] Park C H, Kim J W. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular meshwork cells [J]. *Kor J Ophthalmol*, 2012, 26(2): 123-131.
- [11] Karumanchi D K, Karunaratne N, Lurio L, *et al.* Non-enzymatic glycation of α -crystallin as an *in vitro* model for aging, diabetes and degenerative diseases [J]. *Amino Acids*, 2015, 47(12): 2601-2608.
- [12] 颜冰希, 余珊珊, 冯晓, 等. D-半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞衰老的影响 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2013, 42(6): 625-631.
- [13] 吴丽丽, 王立群, 王达, 等. 形态学观察晚期糖基化终末产物诱导微血管内皮细胞核因子 κ B 入核及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(3): 198-202.
- [14] 郑超, 文格波, 曹仁贤, 等. 糖基化终末产物对人脐静脉内皮细胞凋亡及其受体表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 19(2): 115-118.
- [15] Seoungwoo S, Dahee S, Minkyung K, *et al.* Ameliorating effect of *Akebia quinata* fruit extracts on skin aging induced by advanced glycation end products [J]. *Nutrients*, 2015, 7(11): 9337-9352.
- [16] Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky J D, Campisi J, *et al.* Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo* [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(12): 1798-1806.
- [17] Wang H, Wei S, Xue X, *et al.* Adipose stem cells' antagonism in glycosylation of D-galactose-induced skin aging of nude mice and its skin recovery function [J]. *Inter J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 29(3): 376.
- [18] 吴一兵, 张嫡群, 王云志. 欧亚旋覆花化学成分进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(3): 503-507.
- [19] Baynes J W. The role of AGEs in aging: causation or correlation [J]. *Exper Gerontol*, 2001, 36(9): 1527.
- [20] Giardino R, Giavaresi G, Fini M, *et al.* The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2002, 30(3): 189-198.